

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D - 4 AUG 1998

WIPO, PCT



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Bescheinigung

Die BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH in Ingelheim am Rhein/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Komplexe für den Transport von Nukleinsäure in höhere eukaryotische Zellen"

am 20. Juni 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 H, A 61 K und C 08 L der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 14. April 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Schulenburg

Zeichen: 197 26 186.8

Case 12/191

DI Fa/dc

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

D-55216 Ingelheim am Rhein

Titel: Komplexe für den Transport von Nukleinsäure in
höhere eukaryotische Zellen

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet des Gentransfers.

Es ist bekannt, daß die Komplexierung von DNA mit Polyethylenimin (PEI) erfolgreich eingesetzt werden kann, um Gene in die Zelle zu transportieren (Boussif et al., 1995; Boussif et al., 1996; Abdallah et al., 1996). Der Gentransfer erfolgt dabei dadurch, daß die Komplexe ungerichtet an Zellen gebunden und aufgenommen werden. Um eine Spezifität der Bindung zu erreichen, wurden verschiedene Liganden, z.B. Transferrin (Tf) oder Antikörper kovalent an PEI gekoppelt, um die Gene über den Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose in die Zelle zu transportieren (Kircheis et al., 1997). Auch bei dieser Methode bleibt jedoch ein gewisser Anteil des erzielten Gentransfers unspezifisch, was auf eine Aufnahme der Komplexe in die Zelle unabhängig vom Liganden zurückzuführen ist.

Für die effiziente Anwendung der Gentherapie *in vivo* gibt es, neben der Spezifität, weitere Voraussetzungen, die es zu erfüllen gilt. Dazu zählt für viele Anwendungen eine möglichst geringe Größe der Komplexe. Das Erfordernis möglichst kleiner Komplexe ist u.a. durch die physikalischen Gegebenheiten im Organismus bedingt, wie zum Beispiel den geringen Durchmesser vieler Blutgefäße; ein Erreichen bestimmter Gewebe ist nur durch kleine, nicht aggregierende Komplexe möglich. Soll die Aufnahme der Komplexe durch rezeptorvermittelte Endozytose erfolgen, so ergibt sich eine Größenlimitierung von max. 200nm, um eine Aufnahme in die "coated pits" zu ermöglichen (Stryer 1990).

Polykation/DNA-Komplexe weisen gegenüber viralen Systemen den Vorteil geringer Immunogenität und geringer

Risiken auf, sind jedoch im Vergleich zu viralen Gentransfermethoden weniger effizient (Hodgson et al., 1995). Dieser Nachteil kann grundsätzlich durch den Einsatz größerer Mengen an zu transferierender DNA ausgeglichen werden. In Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung zeigte sich jedoch, daß durch Erhöhung der Konzentration an DNA und Polykation die Tendenz zur Aggregatbildung bei der Komplexierung zunimmt.

Ein limitierender Faktor beim Gentransfer ist ferner die unspezifische Immunabwehr im Blutstrom des Organismus durch sog. Opsonisierung, welche eine der ersten Barrieren ist, die Gentransferpartikel *in vivo* überwinden müssen. Dabei binden Plasmaproteine an eingedrungene Bakterien, Viren oder andere Fremdkörper und lösen dadurch weitere Abwehrmechanismen des Immunsystems aus (Roitt et al. 1991). Die Bedeutung der Proteinbindung an Liposomen, wie sie für den Gentransfer verwendet werden können, wurde von Chonn et al., 1992 gezeigt. Hier konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an gebundenem Protein und der Halbwertszeit der Liposomen im Blutstrom nachgewiesen werden.

Eine weitere wichtige Komponente der unspezifischen Immunabwehr ist die Aktivierung des Komplementsystems. Viele kationische Lipide und andere Polykationen, die für den Gentransfer verwendet werden, zeigen eine starke Komplementaktivierung (Chonn, et al., 1991; Plank et al., 1996). In der Natur vorkommende sogenannte Dysopsonine können ein Anheften dieser Proteine verhindern (Absolom, 1986). So können zum Beispiel Bakterien der Opsonisierung entgehen, indem sie an ihrer Oberfläche hoch hydrophile Zuckerreste tragen.

Es wurden bereits verschiedene Methoden entwickelt, um eine Opsonisierung von Partikeln zu verhindern. Eine der

am häufigsten angewandten Methoden ist die Verwendung von kovalent gekoppeltem Polyethylenglykol (PEG) (Mori et al., 1991; Chonn et al., 1992; Woodle et al., 1994). Dabei konnte sowohl eine reduzierte Proteinbindung als auch eine verlängerte Halbwertszeit der verwendeten Liposomen im Blutstrom gezeigt werden.

Die Menge des eingesetzten PEG betrug meist zwischen 2 und 10 % PEG-gekoppeltem Lipid im Liposom (m/m), das Molekulargewicht von PEG zwischen 750 und 5000 D (Klibanov et al., 1990.; Blume et al, 1990; Mayhew et al, 1992; Papahadjopoulos et al, 1991; Senior et al, 1991; Mori et al, 1991; Yoshioka, 1991). Für die sterische Stabilisierung von Partikeln wurde von Woodle et al., 1994, die Bedeutung des Molekulargewichts gezeigt. Dabei erwiesen sich PEG-Derivate ab einer Größe von 2000 D bis 5000 D geeignet; in der Arbeit von Torchilin et al., 1992 zeigten sich PEG-Derivate mit einem Molekulargewicht 5000 D als geeignet.

Klibanov et.al 1991 beschrieb die stabilisierende Wirkung von PEG 5000 D in Liposomen, die spezifische Liganden enthalten (sog. Immunoliposomen). Dabei konnte aber festgestellt werden, daß dieses PEG zu einer etwas verschlechterten Bindung des Liganden an den Rezeptor führt. In Torchilin et.al 1992, wird jedoch gezeigt, daß die verlängerte Halbwertszeit der Immunoliposomen durch PEG-coating und somit eine Verringerung der unspezifischer Aufnahme durch das RES (retikuloendotheliale System) die verschlechterte Ligand-Rezeptor Interaktion mehr als kompensiert.

Von Kirpotin et.al., 1997, wird die Anwendung bifunktionaler PEG's, deren Herstellung von Zalipsky et. al., 1997, näher dargestellt wird, für die

nachträgliche Kopplung von Liganden an PEG-Liposomen gezeigt.

Ähnliche Ergebnisse wie mit PEG konnten für Liposomen mit Gangliosiden von Mori et al., 1991), und für Polystyren- und Goldpartikel mit Co-Polymeren aus Polyoxyethylen und Polyoxypropylen (Moghimi et al., 1993) erreicht werden. Um die Aktivierung des Komplementsystems zu verringern, wurden DNA/Polylysinkomplexe ebenfalls mit PEG modifiziert (Plank et al., 1996). Eine Erhöhung der Spezifität sogenannter Immunoliposome konnte von Torchilin et al., 1992, gezeigt werden. Dabei zeigten Liposomen, die sowohl Antikörper für ein bestimmtes Gewebe als auch PEG enthalten, eine deutlich bessere Spezifität als Liposomen ohne PEG.

Versuche von Torchilin et al., 1994, ergaben, daß amphiphile Vinylpolymere die Halbwertszeit von Liposomen *in vivo* deutlich verlängern können. Torchilin und Papisov, 1994, zeigten, daß für den Schutzeffekt von PEG und die dadurch bewirkte längere Halbwertszeit von Liposomen die Beweglichkeit der Polymerkette verantwortlich sein dürfte.

Die bisherigen Versuche zur Verringerung der Interaktion von DNA/Polykationkomplexen mit dem Komplementsystem beschränkten sich auf Polylysin enthaltende Komplexe (Plank et al., 1996). Dabei wurde der Effekt beobachtet, daß durch das Koppeln von PEG an positiv geladene DNA/Polylysin Komplexe eine Verringerung der Komplementaktivierung erreicht werden kann.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein alternatives Gentransfersystem bereitzustellen, das

effizient und sehr spezifisch sowie für *in vivo* Anwendungen geeignet ist.

Die Lösung dieser Aufgabe besteht in Komplexen aus Nukleinsäure und Polyethylenimin, die dadurch gekennzeichnet sind, daß das Polyethylenimin mit einem daran kovalent gekoppelten hydrophilen Polymeren modifiziert ist.

Im folgenden werden die erfindungsgemäßen Komplexe der Einfachheit halber als DNA/PEI/Polymer-Komplexe bezeichnet.

Das Verhältnis von DNA zu PEI wird im folgenden durch die Angabe des molaren Verhältnisses der Stickstoffatome im PEI zu den Phosphataten in der DNA angegeben (N/P-Wert); ein N/P-Wert von 6.0 entspricht einer Mischung von 10 µg DNA mit 7,5 µg PEI, bei diesem Verhältnis sind die Komplexe annähernd elektroneutral.

Der N/P-Wert der Komplexe kann über einen breiten Bereich schwanken, er kann im Bereich von etwa 2 bis etwa 100 gelegen sein. Bevorzugt beträgt das Verhältnis etwa 2 bis etwa 20, besonders bevorzugt beträgt das Verhältnis 3 bis 10.

Im einzelnen kann der N/P-Wert für den speziellen Anwendungsfall, z.B. für den zu transfizierenden Zelltyp, durch Vorversuche ermittelt werden, indem unter ansonsten identischen Bedingungen das Verhältnis erhöht wird, um das im Hinblick auf die Transfektionseffizienz optimale Verhältnis festzustellen und einen für die Zellen toxischen Effekt auszuschließen.

Das in den Komplexen enthaltene PEI weist ein Molekulargewicht von ca. 700 D bis ca 2000000 D auf.

Größere PEI-Moleküle ergeben nach Komplexierung mit DNA bereits bei niedrigeren N/P Verhältnissen ein Optimum der Transfektionseffizienz, sie resultieren im allgemeinen in einer sehr guten Transfektionseffizienz. Kleinere Moleküle, von denen pro vorgegebener DNA-Menge eine größere Menge zur Komplexierung erforderlich ist, haben, bei geringerer Effizienz, den Vorteil einer geringeren Toxizität. Welches PEI-Molekül im einzelnen verwendet wird, kann in Vorversuchen ermittelt werden.

Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind PEI-Moleküle im Molekulargewichtsbereich zwischen 2000 und 800000.

Beispiele für kommerziell erhältliches PEI mit unterschiedlichen Molekulargewichten, das im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet ist, sind PEI 700 D, PEI 2000 D, PEI 25000 D, PEI 750000 D (Aldrich), PEI 50000 D (Sigma), PEI 800000 D (Fluka). Von BASF wird PEI unter dem Markennamen Lupasol® ebenfalls in verschiedenen Molekulargewichten angeboten (Lupasol® FG: 800 D; Lupasol® G 20 wasserfrei: 1300 D; Lupasol® WF: 25000 D; Lupasol® G 20: 1300 D; Lupasol® G 35: 2000 D; Lupasol® P: 750000 D; Lupasol® PS: 750000 D; Lupasol® SK: 2000000 D).

Das hydrophile, an PEI gebundene Polymere ist vorzugsweise linear bzw. in einem nur geringen Ausmaß verzweigt, so daß seine Beweglichkeit weitgehend erhalten bleibt. (Ohne auf diese Theorie festgelegt sein zu wollen, dürfte die positive Wirkung des Polymeren, neben seiner Hydrophilie, auf seine Beweglichkeit zurückzuführen sein.)

Beispiele für hydrophile, an PEI gekoppelte Polymere, sind ausgewählt aus der Gruppe Polyethylenglykole (PEG),

Polyvinylpyrrolidone, Polyacrylamide, Polyvinylalkohole, oder Copolymere dieser Polymere.

Bevorzugt als hydrophiles Polymer ist PEG.

Das Molekulargewicht des hydrophilen Polymeren beträgt im allgemeinen etwa 500 bis etwa 20000 D, vorzugsweise werden Moleküle mit einem Molekulargewicht von 1000 bis 10000 D eingesetzt.

Die Menge an Polymer für die Kopplung an PEI wurde anhand von PEG in Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung aus der Analyse der Anzahl primärer Amine im PEI-Molekül mittels Ninhydrin-Assay (Sarin et al, 1981) bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, daß ca. jedes dreizehnte Stickstoffatom in Form eines primären Amines vorliegt. Daher wurde als Ausgangspunkt ein Gewichtsverhältnis von PEG-5000 D-Derivat zu PEI von 9,2 gewählt. Dieses entspricht größenordnungsmäßig einem molaren Verhältnis PEG: primäre Aminogruppen/PEI-Molekül von 1:1.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Experimente sowie Begleitversuche zeigten, daß ein molares Verhältnis Polymer: primäre Aminogruppen/PEI in einem Bereich von 1:10 bis 10:1 für die sterische Stabilisierung von DNA/PEI Komplexen, je nach Anwendungsfall, geeignet ist. Bevorzugt beträgt der Bereich 1:5 bis 5:1, besonders bevorzugt 1:3 bis 1:1.

PEI ist gegebenenfalls mit einem zellulären Liganden modifiziert, um die spezifische Aufnahme der Komplexe durch Bindung an Zelloberflächenproteine, insbesondere Rezeptoren, zu bewirken. Beispiele für Liganden sind in der WO 93/07283 angeführt, bevorzugt wird als Ligand Transferrin verwendet.

Das für einen bestimmten Transfektionsansatz jeweils am besten geeignete Polymermolekül kann, nach Typ, Molekulargewicht und Menge, in Vorversuchen ermittelt werden, ebenso die Zweckmäßigkeit der Modifikation von PEI mit einem zellulären Liganden. Bei derartigen Vorversuchen wird von einem vorgegebenen DNA/PEI Komplex ausgegangen und das Polymere hinsichtlich Art und Menge variiert, dann wird die Stabilität der Komplexe unter den gewählten Transfektionsbedingungen verglichen. Im Hinblick auf die Notwendigkeit bzw. Auswahl eines Liganden werden Komplexe, die bis auf das Vorhandensein oder Fehlen eines zellulären Liganden identisch sind, hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz miteinander verglichen.

Der Ligand wird an PEI mittels herkömmlicher Methoden gekoppelt, z.B. auf chemischem Weg, wie in der WO 93/07283 für die Kopplung von Virus, Virusproteinen oder -peptiden mit Polyaminverbindungen beschrieben.

In einer Ausführungsform der Erfindung ist PEI mit dem Liganden über das hydrophile Polymere verbunden. Diese Ausführungsform weist den Vorteil auf, daß hinsichtlich der Polymergröße geringere Einschränkungen auftreten, weil die Zugänglichkeit des Liganden, der sich in dieser Anordnung außerhalb der Polymerschicht befindet, und dessen Bindung an den Rezeptor nicht durch das Polymere blockiert wird.

Die in den erfindungsgemäßen Komplexen enthaltene Nukleinsäure wird vor allem durch den in der Zelle zu erzielenden biologischen Effekt definiert, im Falle der Anwendung im Rahmen der Gentherapie durch das zur Expression zu bringende Gen bzw. den Genabschnitt, z.B. zwecks Substitution eines defekten Gens, oder durch die

Zielsequenz eines zu inhibierenden Gens. Bei den in die Zelle zu transportierenden Nukleinsäuren kann es sich um DNAs oder RNAs handeln, wobei hinsichtlich der Nukleotidsequenz keine Beschränkungen bestehen.

Die erfindungsgemäßen Komplexe haben den Vorteil, daß sie in geringer Größe herstellbar sind, wobei dieser Effekt durch einen gegebenenfalls an PEI gekoppelten Liganden nicht beeinträchtigt wird.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Herstellung der DNA/PEI-Polymer-Komplexe.

Die Herstellung von DNA/PEI/Polymer-Komplexen kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen.

Bevorzugt werden zuerst DNA und PEI durch Mischen der Lösungen komplexiert und anschließend, z.B. nach einer Reifungszeit von etwa 20-40 Minuten, kann die Reaktion mit dem Polymeren (im Fall der Reaktion mit PEG die "PEGylierung") erfolgen, wie sie in den Beispielen der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurde. Im Zuge der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß Komplexierung bei hohen Konzentrationen der Komplexpartner einen deutlich höheren Anteil an aggregierten Komplexen liefert (siehe Beispiel 3c). Es wurde festgestellt, daß diese unerwünschte Aggregation durch Mischen der Komplexe aus sehr verdünnten Lösungen weitgehend hintangehalten werden kann. Die Verringerung der Salzkonzentration unter den physiologischen Wert verringert den Effekt der Aggregatbildung (Beispiel 1). Die Verwendung von entionisiertem Wasser anstatt physiologischer Salzkonzentration kann die Aggregation verhindern (Beispiel 1). Es hat sich gezeigt, daß physiologische Glukosekonzentrationen keinen Einfluß auf die Aggregatbildung haben (s. Fig. 1). Es zeigte sich,

daß eine Erhöhung der Salzkonzentration auf einen Wert im physiologischen Bereich im Anschluß an die Komplexierung sich nicht negativ auf die Stabilität der Komplexe auswirkt, während Komplexe ohne PEG rasch Aggregate bildeten (Fig. 2a).

Vorzugsweise wird daher die Komplexierung bei niedrigen Konzentrationen der Komplexpartner, vorzugsweise bei ca. 5 bis 50 $\mu\text{g DNA/ml}$, insbesondere 10 bis 40 $\mu\text{g DNA/ml}$, durchgeführt. Die PEI-Konzentration wird, entsprechend dem jeweiligen N/P-Wert, auf die DNA-Konzentration abgestimmt; sie beträgt z.B. 1,25 $\mu\text{g/ml}$ PEI 800000 D bei einem N/P-Wert von 2 und einer DNA-Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$; bei einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ entsprechend 12,5 $\mu\text{g/ml}$ PEI 800000 D. Die Komplexierung wird außerdem bei möglichst niedriger Ionenkonzentration durchgeführt, um ein Auftreten von Aggregaten bereits bei der Komplexierung oder unmittelbar anschließend daran zu verhindern. Gegebenenfalls wird, im Hinblick auf die weitere direkte Verwendung der Komplexe *in vivo*, die Komplexierung in Gegenwart physiologischer Zuckerkonzentration (Dextrose, Glukose, Saccharose) durchgeführt.

Die Verhinderung der Aggregation der Komplexe ist vermutlich durch die Ausbildung einer dickeren Hydratationshülle bewirkt, die das Zusammenklumpen der Komplexe verhindert.

In einer alternativen Methode werden Komplexe aus verdünnten Lösungen erhalten, wobei PEI eingesetzt wird, das bereits mit dem Polymeren, z.B. PEG, kovalent gekoppelt ist (Beispiel 2b). Auch hier zeigte sich der stabilisierende Effekt von PEG, welches das Aggregieren der Komplexe auch nach Salzzugabe verhindert.

Die kovalente Kopplung des Polymeren an PEI kann mittels herkömmlicher Methoden durchgeführt werden, wobei Polymer-Derivate verwendet werden, die an die freien Aminogruppen von PEI binden können. Unterschiedliche Derivate sind kommerziell erhältlich, z.B. die entsprechenden PEG-Derivate (Shearwater Polymers, USA):

- N-Hydroxysuccinimidylaktivester (Abuchowski et al, 1984; Klibanov et al, 1990 zeigten die Verwendbarkeit der entsprechenden PEG-Derivate für die Modifizierung von Liposomen); Beispiele für kommerziell erhältliche PEG-Derivate dieses Typs sind Methoxy-SS-PEG, MW 5000 D; Methoxy-SSA-PEG, MW 5000 D; Succinimidylsuccinat-Propionsäure-Derivate (Methoxy-SPA-5000, MW 5000 D; Methoxy-SPA-20000, MW 20000 D; Methoxy-SSPA-PEG, MW 5000); Oxycarbonylimidazol-Derivate, die unter Urethanbildung reagieren (die Bindung von PEG-Derivaten dieses Typs an Proteine wurde von Beauchamp et al, 1983, gezeigt, die Verwendung zur PEGylierung von Liposomen
- von Allen et al, 1991; Beispiele für Handelsprodukte sind Methoxy-PEG-CDI, MW 5000 D; Glycidylether (Pita et al, 1970; Elling et al, 1991); Tresylate (die Bindung von PEG-Tresylaten an Proteine und Liposomen wurde beschrieben von Nilsson et al, 1984; Yoshinaga et al, 1989; Delgado et al, 1990; Dust et al, 1990; Senior et al., 1991; Klibanov et al, 1991; Beispiele für kommerziell erhältliche PEG-Tresylate sind Methoxy-PEG-Tres, MW 5000; Methoxy-PEG-Tres, MW 200); Aldehyde, deren Bindung mit Natriumcyanborhydrid an Aminogruppen erfolgt (Wirth et al, 1991; Handelsprodukte sind Methoxy-PEG-ald, MW 5000; M-ALD-PEG-200: Methoxy-PEG-ald, MW 2000).

Im Falle der Gegenwart eines zellulären Liganden in den Komplexen wird bei der Herstellung wie folgt vorgegangen:

In einer Ausführungsform wird das PEI an den Liganden gekoppelt, wie in der EP-A1 388 758 bzw. von Kircheis et al., 1997, beschrieben, im Anschluß daran wird die Komplexierung mit den übrigen Reaktionspartnern vorgenommen, wie oben beschrieben.

Um Komplexe herzustellen, in denen die Bindung des Liganden an PEI über das Polymere erfolgt, werden bifunktionelle Polymere verwendet, die an beiden Molekülenden unterschiedliche reaktive Gruppen aufweisen. Dazu können Polymere, z.B. PEG, verwendet werden, wie sie bisher für die Kreuzvernetzung unterschiedlicher Makromoleküle verwendet wurden, z.B. für die Vernetzung von Cofaktor und Apoenzym (Nakamura et al, 1986), Zielsteuerung polymerer Wirkstoffe (Zalipsky und Barany, 1990) oder PEG-Beschichtung von Oberflächen und Proteinen (Harris et al, 1989). Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung u.a. verwendbaren bifunktionellen Derivate sind kommerziell erhältlich, sie enthalten Aminogruppen, Hydroxygruppen oder Carbonsäuregruppen an den Molekülenden, z.B. wie von Shearwater Polymers erhältliche Produkte. Ebenfalls verwendbare Derivate sind NHS-Maleinimid- und NHS-Vinylsulfonderivate, die ihre Reaktionsoptima bei unterschiedlichen pH-Werten haben. Auch Biotin-PEG-Maleinimid oder -NHS Derivate können verwendet werden, wobei an die MAL bzw. NHS Gruppe eine kovalente Kopplung erfolgen kann und die biotinylierte Seite mit Streptavidin enthaltenden Molekülen oder Partikel reagieren kann.

Bei Verwendung bifunktioneller Polymere ergeben sich für die Bildung von DNA/PEI/Ligand/Polymer-Komplexen mehrere Möglichkeiten: Dabei kann die Kopplung von bifunktionellem Polymer, z.B. PEG, an PEI erfolgen und ein Ligand mit passender funktioneller Gruppe an die zweite, freigebliebene funktionelle Gruppe am Polymer, wahlweise vor oder nach Komplexierung mit DNA, gekoppelt werden. Die Bindung PEG-PEI kann über die primären Amine des PEI erfolgen, wobei jedoch auch die vorhergehende Kopplung anderer reaktiver Gruppen, wie SH-Gruppen, an PEI möglich ist, die als Reaktionspartner für PEG-Derivate fungieren können. Auch ist die vorhergehende Kopplung von Liganden an bifunktionelles PEG möglich, wobei die weitere Bindung an PEI vor oder nach Komplexierung mit DNA möglich ist. In all diesen Fällen ergeben sich dabei, besonders bei der Verwendung kleiner Liganden, Vorteile, die bei einer eventuellen nachträglichen PEGylierung durch das PEG abgeschirmt werden können.

Durch die Verwendung bifunktioneller PEG Derivate funktioniert das lineare, hydrophile Polymer-Molekül gewissermaßen als Abstandhalter zwischen PEI und Ligand.

Für bestimmte *in vivo* Anwendungen ist es im Hinblick auf eine hohe Gentransfereffizienz erforderlich, daß die erfindungsgemäßen Komplexe in hoher Konzentration, zweckmäßig in einer Konzentration von mindestens ca. 200 µg DNA/ml, vorliegen. Die Komplexkonzentration kann, bei höherem Gehalt an hydrophilem Polymer, bis zu ca. 1 mg/ml betragen.

Die erfindungsgemäßen Komplexe weisen überrascherweise den Vorteil auf, daß sie aus verdünnten Lösungen auf die erforderliche hohe Konzentration gebracht werden können,

ohne daß eine nennenswerte Aggregatbildung, die die Gentransfereffizienz beeinträchtigen würde, auftritt.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt eine Zusammensetzung für die Transfektion höherer eukaryotischer Zellen, die DNA/PEI/PEG Komplexe in einer Konzentration, bezogen auf DNA, von etwa 200 µg/ml bis etwa 1 mg/ml enthält.

Insbesondere liegt die Zusammensetzung in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung vor. In dieser Ausgestaltung dient die Zusammensetzung zur Transfektion von Säugetierzellen *in vivo*; sie enthält als aktiven Bestandteil einen Komplex, der eine therapeutisch wirksame Nukleinsäure enthält. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann, bei lokaler Anwendung, eine hohe Konzentration an therapeutisch wirksamer DNA im Gewebe erzielt werden. Bei der systemischen Anwendung hat die Zusammensetzung den Vorteil, daß die Komplexe wegen der Verhinderung der Opsonierung weder unspezifischer Bindung noch Abbau unterliegen.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann z.B. vorteilhaft für die Therapie von Tumorerkrankungen verwendet werden, um intratumoral DNA, kodierend für ein oder mehrere Zytokine, wie Interleukin-2, IFN-α, IFN-γ, TNF-α oder ein Selbstmordgen, wie das Herpes Simplex Thymidinkinase-Gen, zu verabreichen. Eine weitere Anwendung, bei der die Vorteile der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zum Tragen kommen, ist die sog. genetische Tumorstimmung. Die dabei zur Anwendung kommenden Komplexe enthalten DNA, die für ein oder mehrere Tumorstimmantigene kodiert.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung liegt bevorzugt als Lyophilisat vor, gegebenenfalls unter Zusatz von Zucker, wie Saccharose oder Dextrose, in einer Menge, die in der gebrauchsfertigen Lösung eine physiologische Konzentration ergibt. Die Zusammensetzung kann auch in Form eines Kryokonzentrats vorliegen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung für die Transfektion von Säugetierzellen, bei dem zunächst Komplexe aus verdünnten Lösungen der Komplexpartner hergestellt und anschließend auf eine Konzentration von mindestens 200 $\mu\text{g/ml}$ gebracht werden.

Das Aufkonzentrieren der Komplexe kann mittels herkömmlicher Methoden, z.B. durch Ultrafiltration oder durch Ultrazentrifugation, vorgenommen werden.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können gegebenenfalls in Form eines Kits vorliegen, wobei die Einzelkomponenten DNA einerseits und Polymer-modifiziertes PEI, an das gegebenenfalls ein Ligand gekoppelt ist, andererseits, in getrennten Behältern vorliegen.

Figurenübersicht

Fig. 1: Unterdrücken der Aggregatbildung von DNA/PEI-Komplexen durch Mischen unter salzfreien Bedingungen

Fig. 2: Stabilisieren von DNA/PEI-Komplexen mit Polyethylenglykol (PEG)

a) Kovalente Kopplung von PEG nach der Komplexierung der DNA mit PEI

- b) Kovalente Kopplung von PEG an PEI vor der Komplexbildung mit DNA
- c) Abhängigkeit der Partikelgröße von der Konzentration an DNA und PEI bei der Komplexbildung

Fig. 3: Für die Stabilisierung der Komplexe ist die kovalente Bindung von PEG entscheidend

Fig. 4: Konzentrierung von PEG-stabilisierten DNA/PEI Komplexen

Fig. 5: Interaktion von DNA/PEI Komplexen mit humanem Plasma (Immunoblot)

Fig. 6: Verringerung der Proteinbindung an DNA/PEI Komplexe durch Modifizierung mit PEG

- a) Silberfärbung
- b) Überprüfung der Filtrierbarkeit

Fig. 7: Effekt der PEG-Modifizierung auf den Gentransfer in K562-Zellen

Fig. 8: Effekt der PEG-Modifizierung auf den Gentransfer in murine Neuroblastomzellen

Fig. 9: Verringerung der unspezifischen Aufnahme der Komplexe durch P388 Mausemakrophagen durch Modifizieren der Komplexe mit PEG

Fig. 10: Verringerung der Wechselwirkung mit Plasmaproteinen durch Modifizieren von DNA/Tf-PEI Komplexen mit PEG

Beispiel 1: Unterdrücken der Aggregatbildung von
DNA/PEI-Komplexen durch Mischen unter
salzfreien Bedingungen

Die Bildung der Komplexe erfolgte durch Mischen von gleichen Volumina (250 μ l) verdünnter Lösungen von Plasmid-DNA, enthaltend die für das Reportergen Luciferase kodierende Sequenz (10 μ g des Plasmids pCMVL, beschrieben in der WO 93/07283) und 7,5 μ g PEI (N/P-Wert: 6.0) bzw. 9 μ g PEI (N/P-Wert 7,2) durch rasches, mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Lösungen, um eine möglichst schnelle Mischung der beiden Komponenten zu erreichen. Es wurde PEI mit einem Molekulargewicht von 800000 Dalton verwendet (Fluka). Die Endkonzentration an DNA im Komplex betrug 20 μ g/ml. Für Transferrin (Tf) enthaltende Komplexe wurden Konjugate mit kovalent an PEI gebundenem Tf verwendet, deren Herstellung von Kircheis et al., 1997, beschrieben wurde. Es wurden zwei verschiedene Konjugate verwendet: Tf2PEI (molares Verhältnis von Tf/PEI 2/1) und Tf4PEI (molares Verhältnis von Tf/PEI 4/1). Der Vergleich der Komplexmischung in HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,3); in entionisiertem Wasser (MQ) allein und in MQ mit 5 % Glukose ist in Fig. 1 dargestellt. Die mittlere Partikelgröße wurde nach verschiedenen Zeiten mittels quasielastischer Laserlichtstreuung (Brookhaven BI-90) gemessen. Es zeigte sich, daß Komplexe in HBS schon nach kurzer Zeit aggregierten, während Komplexe, die in entionisiertem Wasser hergestellt wurden, eine stabile Größe aufwiesen, die durch eine physiologische Glukosekonzentration nicht wesentlich beeinträchtigt wurde.

Beispiel 2: Stabilisieren von DNA/PEI-Komplexen mit
Polyethylenglykol (PEG)

a) Kovalente Kopplung von PEG nach der Komplexierung der
DNA mit PEI

Die DNA/PEI-Komplexe mit einem N/P Verhältnis von 6.0 wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, gemischt und zur vollständigen Komplexierung 40 min bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Anschließend wurden 69 µg Methoxy-succinimidyl-propionat-PEG (M-SPA-PEG, Molekulargewicht von 5000 Dalton, Shearwater Polymers, Inc., USA, Stammlösung 10 mg/ml in DMSO) in 50 µl MQ Wasser zugesetzt. (Dabei entsteht zwischen M-SPA-PEG und den Aminogruppen des PEI eine kovalente Bindung.) Die Reaktionsdauer betrug 20 min bei RT; das Gewichtsverhältnis (w/w) von PEG zu PEI betrug 9,2.

Die Komplexgröße wurde nach verschiedenen Zeiten mittels quasielastischer Laserlichtstreuung gemessen. Um die erfolgreiche Stabilisierung der Komplexe zu zeigen, wurden der Komplexlösung ein 250 µl Aliquot PBS (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,6 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4) zugesetzt. Durch diese Erhöhung der Salzkonzentration wurde die Aggregation von sterisch nicht stabilen Komplexen hervorgerufen, während die PEG-modifizierten Komplexe keine Größenveränderung zeigten (Fig. 2a).

b) Kovalente Kopplung von PEG an PEI vor der
Komplexbildung mit DNA

Die PEGylierung von PEI vor der Komplexierung ("pre-PEGylierung") wurde wie folgt durchgeführt: 7,5 µg PEI wurden mit 6,9 µl M-SPA-PEG 10 mg/ml in DMSO gemischt und die Reaktion nach 20 min bei RT durch Zugabe von 0,2 µMol Glycin abgestoppt. (Dabei reagiert das noch

vorhandene freie M-SPA-PEG mit der Aminogruppe des Glycin.) Nach weiteren 20 min wurde die Lösung mit MQ auf 250 μ l aufgefüllt und, wie in Beispiel 2a beschrieben, mit 10 μ g DNA komplexiert. Die weitere Vorgangsweise erfolgte ebenfalls wie in Beispiel 2a beschrieben.

Die verwendeten Komplexe wiesen einen N/P-Wert von 6,0 auf, das Verhältnis von PEG/PEI betrug 9,2 (w/w).

Die nachträgliche PEGylierung ("post-PEGylierung") der Komplexe erfolgte wie in Beispiel 2a beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, daß auch mit vorhergehender PEGylierung von PEI sterisch stabile Komplexe gebildet werden können, der durchschnittliche Durchmesser der Partikel ist aber etwas größer als bei nachträglicher PEGylierung (Fig. 2b).

c) Abhängigkeit der Partikelgröße von der Konzentration und DNA und PEI bei der Komplexbildung

Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, in MQ gemischt, mit PEG modifiziert und der mittlere Partikeldurchmesser mittels LLS gemessen. Die DNA-Konzentration bei der Komplexbildung betrug 20 bzw. 320 μ g/ml. Die Größenmessung erfolgte nach der PEGylierung. Es zeigte sich deutlich, daß durch Mischen in höheren Konzentrationen mehr Aggregate entstehen (Fig. 2c).

Beispiel 3: Für die Stabilisierung der Komplexe ist die kovalente Bindung von PEG entscheidend

In diesem Experiment wurde ein Gewichtsverhältnis von PEG zu PEI von 9,2 gewählt. Es wurde einerseits, wie in den vorigen Beispielen, Methoxy-succinimidyl-propionat-PEG (M-SPA-PEG 5000) verwendet, andererseits PEG unterschiedlichen Molekulargewichtes ohne reaktive

Gruppen (6000 D: Merck, No. 807491; 4000 d: Loba Feinchemie, No. 81252; 1500 d: Merck, No. 807489) mit mittleren Molekulargewichten von 6000, 4000 und 1500 Dalton verwendet. Die Komplexgröße wurde nach verschiedenen Zeiten mittels quasielastischer Laser Lichtstreuung gemessen. Nach PEGylierung wurde der Komplexlösung ein 250 μ l Aliquot PBS zugesetzt. Fig. 3 zeigt, daß nur kovalente Bindung von PEG an den Komplex die Aggregation der Komplexe nach Salzzugabe verhindert.

Beispiel 4: Konzentrierung von PEG-stabilisierten DNA/PEI Komplexen

Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, gemischt und, wie in Beispiel 2 beschrieben, mit M-SPA-PEG stabilisiert. Nach der Stabilisierung und Zugabe von 250 μ l PBS wurde die Komplexlösung (ca. 800 μ l) in Mikrokonzentratoren (Vivaspin 500, molekulares Ausschlußvolumen 100000 Dalton) mit 12000 g bis auf ein Volumen von ca 25 μ l und somit eine DNA Konzentration von ca 400 μ g/ml DNA konzentriert. Anschließend wurde mit MQ wieder eine Konzentration von 20 μ g/ml eingestellt und die Größe mittels quasielastischer Laser Lichtstreuung gemessen. Fig. 4 zeigt, daß ohne PEG-Modifizierung nach dem Konzentrieren aufgrund Aggregation und/oder Absorption der Komplexe an die Membran keine sinnvollen Partikelgrößen mehr gemessen werden konnten, während die stabilisierten Komplexe auch nach Konzentrierung keine Aggregatbildung aufwiesen.

Beispiel 5: Interaktion von DNA/PEI Komplexen mit humanem Plasma

Dieses Experiment diente dazu, die Interaktion von Plasmaproteinen mit den PEI-Komplexen zu bestimmen,

wobei die an die Komplexe gebundenen Proteine zusammen mit diesen abgetrennt wurden.

Es wurde humanes Citratplasma (Sigma) verwendet. In diesem Experiment wurden die Komplexe in folgender Weise gemischt: 12,8 µg DNA in 20 µl MQ wurden mit 9,6 µg PEI in ebenfalls 20 µl MQ gemischt und wie in Beispiel 2 beschrieben modifiziert. Anschließend wurden die Komplexe mit einem Aliquot verdünntem Plasma 30 min bei 37°C inkubiert.

a) Identifizierung der an DNA/PEI Komplexe bindenden Plasma-Proteine

In diesem Experiment wurden 40 µl Komplex mit einer DNA Konzentration von 320 µg/ml mit 140 µl 1:70 verdünntem Plasma 30 min bei 37°C inkubiert. Die Komplex/Plasma Lösung wurde auf Mikrofiltrationseinheiten mit einer Filter-Porengröße von 0,2 µm (Whatman, England, Anopore membrane) aufgetragen. Die Membran wurde vorher mit einer BSA Lösung (1 mg/ml) abgesättigt und dreimal mit HBS (20 mM HEPES pH 7.3, 145 mM NaCl) gewaschen, um unspezifische Proteinbindung zu reduzieren. Die aufgetragene Lösung wurde bei 12000 g filtriert und dreimal mit HBS gewaschen. Das am Filter zurückgebliebene Material (Komplexe plus Plasmaproteine) wurde mit HBS + 5% SDS eluiert ("Eluat") und wie das Filtrat der Komplex/Plasmalösung ("Filtrat") nach Zugabe von einem Aliquot fünffach konzentrierten nichtreduzierendem Probenpuffer (25 % Glyzerin (w/v); 290 mM TRIS pH 6,8; 0,25 % SDS (w/v); 0,1 mg/ml Bromphenolblau) auf einem SDS-Polyacrylamidgel mit einem Polymergradienten von 2,5 bis 12 % aufgetrennt.

Für die immunologische Identifizierung der Proteine wurde das Gel in einer "semi dry" Blot-Apparatur (Bio

Rad) auf eine Nitrozellulosemembran geblottet, unspezifische Bindungsstellen mit einer 1%igen Milchpulverlösung abgesättigt und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Die Antikörper wurden in TBST (150 mM NaCl; 10 mM TRIS pH 8,0; 0,1 % TWEEN 20) verdünnt.

1. Antikörper:

Ziege anti-human Complement C3 (fraktioniertes Antiserum, Sigma, Best. No. C-7761, Lot Number 054H8842), Verdünnung 1:3000.

Ziege anti-human Fibrinogen (fraktioniertes Antiserum, Sigma, Best. No. F-2506, Lot Number 115H8828), Verdünnung 1:3000. Ziege anti-human Fibronectin (fraktioniertes Antiserum, Sigma, Best. No. F-1909, Lot Number 094H8868), Verdünnung 1:3000.

2. Antikörper:

Maus anti-Ziege IgG, HRP konjugiert (polyklonal, Jackson Laboratories, Best. No. 205-035-108, Lot Number 33740), Verdünnung 1:25000

Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran mehrfach mit TBST gewaschen und anschließend in Luminol/Enhancer Lösung (Pharmacia, No. 1856135) und Stabiler Peroxid Lösung (Pharmacia, No. 1856136) 1/1 (v/v) 10 min bei RT inkubiert, mehrfach mit TBST gewaschen und ein Film auf dem Blot exponiert.

Der Immunoblot ist in Fig. 5 dargestellt. Es zeigte sich, daß Komplement C3, Fibrinogen, und Fibronectin an die DNA/PEI Komplexe im Eluat binden; ein Effekt, der nach PEGylierung (die Komplexe wurden, wie in Beispiel 2, PEGyliert) deutlich verringert wird (s.

Spuren 4 und 5). Die Kontrollen (Spuren 6 und 7) dienten dazu festzustellen, in welchem Ausmaß diese Proteine ohne Anwesenheit von Komplex an die Filtermembran binden. Bei der Plasmaprobe ohne DNA-Komplexe findet sich das Protein erwartungsgemäß hauptsächlich im Filtrat, im Eluat konnten keine nennenswerten Mengen der Proteine gefunden werden (Spur 1: Humanplasma, 3 μ l, 1:50 verdünnt; Spur 2: DNA/PEI + Plasma, Filtrat, 6 μ l; Spur 3: DNA/PEI + Plasma, Eluat, 20 μ l; Spur 4: 150 μ l Plasma, 1:70 verdünnt, Filtrat, 6 μ l; Spur 5: 150 μ l Plasma, 1:70 verdünnt, Eluat, 20 μ l).

b) Verringerung der Proteinbindung an DNA/PEI Komplexe durch Modifizierung mit M-SPA-PEG

Es wurden Komplexe wie in a) beschrieben gemischt und wie in Beispiel 2 beschrieben mit M-SPA-PEG modifiziert. Die Inkubation mit Plasma, Filtration, Eluierung und elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie in Beispiel 5a beschrieben. Zum semiquantitativen Nachweis wurden die aufgetrennten Proteine mit Silberfärbung (geingfügig modifizierte Methode nach Bloom et al., 1987) angefärbt.

Wie aus Fig. 6a ersichtlich, binden an PEG-modifizierte Komplexe (Spur 5, Eluat) deutlich weniger (nicht sichtbare) Proteinmengen als an unmodifizierte Komplexe (Spur 3). Spur 1: Humanplasma, 3 μ l, 1:50 verdünnt; Spur 2: DNA/PEI + Plasma, Filtrat, 6 μ l; Spur 3: DNA/PEI + Plasma, Eluat, 20 μ l; Spur 4: DNA/PEI-PEG PEG/PEI 9,2/1 (w/w)+ Plasma, Filtrat, 6 μ l; Spur 5: DNA/PEI-PEG PEG/PEI 9,2/1 (w/w)+ Plasma, Eluat, 20 μ l; Spur 6: 150 μ l Plasma, 1:70 verdünnt, Filtrat, 6 μ l; Spur 7: 150 μ l Plasma, 1:70 verdünnt, Eluat, 20 μ l.

c) Überprüfung der Filtrierbarkeit von DNA/PEI
Komplexen:

Um sicherzugehen, daß nach der Filtration ein Großteil der Komplexe auf der Membran zurückgehalten wird, wurden Komplexe (DNA-Konzentration von 320 µg/ml), wie in Beispiel 5a beschrieben, gemischt und PEGyliert. Anschließend wurden die Komplexe durch eine mit BSA abgesättigte Membran filtriert und 3 mal mit je 300 µl HBS gewaschen. Die Absorption der Lösung (A₂₆₀; (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) vor der Filtration (A₂₆₀ vor Filtration), des Filtrates (A₂₆₀ Filtrat) und der drei Waschlösungen (Wasch 1 bis Wasch 3) wurde gemessen. Fig. 6b zeigt, daß unmodifizierte Komplexe vollständig und PEGylierte Komplexe zum Großteil zurückgehalten werden.

Beispiel 6: Effekt der PEG-Modifizierung auf den
Gentransfer in Säugerzellen

a) Transfektion der humanen Zelllinie K562 mit PEG-
modifizierten DNA/(Tf)PEI-Komplexen

Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, gemischt und wie in Beispiel 2 beschrieben mit M-SPA-PEG modifiziert. Die DNA-Konzentration bei der Komplexbildung betrug 20 µg/ml, das Verhältnis von DNA zu PEI betrug N/P 7,2. Es wurden PEI bzw. Tf-PEI Konjugate zur DNA-Komplexierung verwendet, das molare Verhältnis von Tf zu PEI im Konjugat betrug 2/1 (Tf₂PEI). Das Verhältnis von PEG/PEI betrug 2,3/1 bzw. 3,7/1 und 7,4/1 (w/w); das entspricht einem molaren Verhältnis von 0.25:1, 0.4:1 bzw 0.8:1.

Die Kultivierung der Zellen (ATCC CCL-243 K-562) erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 100 iU/ml Penicillin,

100 µg/ml Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS). Pro Transfektionsansatz wurden 500000 Zellen in 24-well Platten (Durchmesser 22,6 mm, Costar) ausgesät. Die Transfektion erfolgte in serumfreiem Medium. Nach vier Stunden wurde das Medium durch serumhaltiges Medium ersetzt. 24 Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen abzentrifugiert, in 100 µl Erntepuffer geerntet (250 mM TRIS, pH 7.2, 0,5 % Triton X 100), homogenisiert, zentrifugiert und je 10 µl aus dem Überstand für die Luciferaseaktivitätsbestimmung in 100 µl Probenpuffer (25 mM Glycylglycin pH 7.8, 5 mM ATP, 15 mM MgCl₂) verdünnt. Die Messung erfolgte nach Injektion von 100 µl Injektionspuffer (200 µM Luziferin (Sigma), 20 mM 25 mM Glycylglycin pH 7.8) in eine Berthold Lumat LB 9507, die Ergebnisse sind in Fig. 7 dargestellt.

b) Transfektion einer murinen Neuroblastom-Zelllinie mit PEG-modifizierten DNA/(Tf)PEI Komplexen

Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, gemischt und, wie in Beispiel 2 beschrieben, mit M-SPA-PEG modifiziert.

Die DNA-Konzentration bei der Komplexbildung betrug 20 µg/ml, das Verhältnis von DNA zu PEI betrug N/P 7,2. Das Verhältnis von PEG/PEI betrug 3,5/1 bzw. 7,0/1 (w/w); das entspricht einem molaren Verhältnis von 0.38:1 bzw. 0.76:1.

Es wurden PEI bzw. Tf-PEI Konjugate zur DNA-Komplexierung verwendet, das molare Verhältnis von Tf zu PEI im Konjugat betrug 2/1 (Tf₂PEI).

Die Kultivierung der Zellen (ATCC CCL 131 Neuro 2A) erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 100 iU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS). Pro Transfektionsansatz wurden 300000 Zellen in

6-well Platten (Durchmesser 35 mm, Costar) ausgesät. Die Transfektion erfolgte in serumfreiem Medium. Nach vier Stunden wurde das Medium durch serumhaltiges Medium gewechselt. 24 Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen in 100 μ l Erntepuffer geerntet (250 mM TRIS, pH 7.2, 0,5 % Triton X 100), homogenisiert, zentrifugiert und je 10 μ l aus dem Überstand für die Luciferaseaktivitätsbestimmung in 100 μ l Probenpuffer (25 mM Glycylglycin pH 7.8, 5 mM ATP, 15 mM MgCl₂) verdünnt. Die Messung erfolgte nach Injektion von 100 μ l Injektionspuffer (200 μ M Luziferin (Sigma), 20 mM 25 mM Glycylglycin pH 7.8) in eine Berthold Lumat LB 9507.

Fig. 7 und 8 zeigen, daß Modifizieren von DNA/PEI und DNA/TfPEI Komplexen den unspezifischen Gentransfer (über PEI vermittelt) stark reduziert, während der rezeptorvermittelte spezifische Gentransfer (über TfPEI vermittelt) nicht (Fig. 7) bzw. in Abhängigkeit vom Zelltyp nur geringfügig (Fig. 8) beeinträchtigt wird.

Beispiel 7: Verringerung der unspezifischen Aufnahme der Komplexe durch P388 Mausmakrophagen durch Modifizieren der Komplexe mit PEG

Die Aufnahme der Komplexe durch die Zellen wurde mit einem fluoreszenzaktivierten Zellsorter (FACS) durchgeführt (FACScan, Becton Dickinson). Die Anregungswellenlänge des Lasers betrug 488 nm. Die Fluoreszenz wurde bei 515 nm gemessen.

Die DNA-Konzentration bei der Komplexbildung betrug 320 μ g/ml, der N/P-Wert 6,0. Das Verhältnis von PEG/PEI betrug 9,2:1; das entspricht einem molaren Verhältnis von 01:1.

Die Komplexe wurden, wie in Beispiel 5a beschrieben, gemischt und, wie in Beispiel 2 beschrieben, mit M-SPA-PEG modifiziert. Die DNA wurde vor der Komplexierung mit YOYO1 (1,1'-(4,4,7,7,-tetramethyl-4,7-diazaundecamethylen)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazol)-2-methyliden]-quinolinium tetraiodid; Molecular Probes) in einem molaren Verhältnis von 100:1 (Basenpaare DNA:YOYO1) markiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (Dulbeccos modified eagle medium) mit 4500 mg/ml Glucose, 100 iU/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS). Pro Ansatz wurden 300000 Zellen in 35 mm Petrischalen (Falcon No 1008) ausgesät. Die Inkubation mit den Komplexen erfolgte in serumfreiem Medium bei 37°C. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 mM EDTA in PBS geerntet.

Das Ergebnis der FACS-Analyse ist in Fig. 9 dargestellt (A: DNA/PEI +/- M-SPA-PEG 37°C, PEG/PEI 9,2/1 w/w). B: DNA/Tf₂PEI +/- M-SPA-PEG 37°C; PEG/PEI 9,2/1 w/w). Die X-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität der gemessenen Zellen, die Y-Achse die Anzahl der gemessenen Ereignisse. Die FACS Daten zeigen, daß durch die PEGylierung die Bindung und Aufnahme der Komplexe an Makrophagen deutlich reduziert wird. Dies zeigt sich in der deutlich verringerten Fluoreszenz der Zellen.

Beispiel 8: Verringerung der Wechselwirkung mit Plasmaproteinen durch Modifizieren von DNA/Tf-PEI Komplexen mit PEG

Es wurden DNA/Tf₂-PEI-Komplexe hergestellt, wie in Beispiel 1 beschrieben (in Wasser gemischt), und, wie in Beispiel 2 beschrieben, mit PEG modifiziert. Die DNA-Konzentration betrug 20 µg/ml, der N/P-Wert betrug 7,2. Das Verhältnis von PEG:PEI betrug 3,5:1 bzw. 7,0:1

(w/w); das entspricht einem molaren Verhältnis von 0,38:1 bzw. 0,76:1. Nach der PEGylierung wurden 500 μ l Komplex mit 7,2 μ l Plasma bei 37°C inkubiert. Zu den in Fig. 10 angegebenen Zeitpunkten wurde die Partikelgröße mittels LLS gemessen. Es wurde festgestellt, daß unmodifizierte Komplexe nach Inkubation mit Plasma Aggregate bilden, während PEGylierte Komplexe hinsichtlich ihrer Größe nicht von verdünntem Plasma unterscheidbar waren. Da die Versuche in entionisiertem Wasser durchgeführt wurden, konnte ein etwa durch Salz hervorgerufener Effekt ausgeschlossen werden.

Literaturliste

- Abdallah, B., et al., 1996, *Hum Gene Ther* 7 (16):
1947-1954
- Absolom, D. R., 1986, *Methods Enzymol* 132; 281-318
- Abuchowski et al, 1984, *Cancer Biochem. Biophys* 7: 175
- Allen et al, 1991, *Biochim Biophys Acta* 1066: 29
- Beauchamp et al, 1983, *Anal. Biochem* 131: 25
- Bloom, H., Beier, H., Gross, H.S., 1987,
Electrophoresis 8: 93-99
- Blume et al, 1990, *Biochim Biophys. Acta* 1029, 91-7
- Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M.
D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P., 1995,
Proc Natl Acad Sci USA 92; 7297-301
- Boussif, O, et al., 1996, *Gene Ther* 3 (12): 1074-1080
- Chamow et al, 1994, *Bioconjugate Chem.*, 5: 133
- Chonn, A.; Cullis, P. R.; Devine, D. V., 1991, *J Immunol*
146; 4234-41
- Chonn, A.; Semple, S. C.; Cullis, P. R., 1992, *J Biol*
Chem 267; 18759-65
- Delgado et al, 1990, *Biotech. Appl. Biochem.*, 12: 119
- Dust et al, 1990, *Macromolecules*, 23:119
- Elling et al, 1991, *Biotech. Appl. Biochem.* 13: 354
- Harris, J.M., et al., 1989, *Polymer Preprints* 30 (2):
356
- Hodgson, C. P., 1995, *Biotechnology* 13; 222-5.
- Joppich et al, 1979, *Macromol. Chem.*, 180: 408
- Kircheis, R.; Kichler, A.; Wallner, G.; Kursa, M.;
Ogris, M.; Felzmann, T.; Buchberger, M.; Wagner, E.,
1997, *Gene Therapy* 4; 409-18
- Kirpotin, et al., 1997, *Biochemistry* 36, 66-75
- Klibanov et al, 1990, *FEBS Letters* 268: 235
- Klibanov et al, 1991, *Biochem. Biophys. Acta*, 1062: 142
- Mayhew et al, 1992, *Int. J. Cancer* 51, 1-8

- Moghim, S. M.; Muir, I. S.; Illum, L.; Davis, S. S.;
Kolb Bachofen, V., 1993, *Biochim Biophys Acta* 1179;
157-65
- Mori, A.; Klibanov, A. L.; Torchilin, V. P.; Huang, L.,
1991, *FEBS Lett* 284; 263-6
- Nakamura, A., et al., 1986, *J Biol. Chem* 261:16792
- Nilsson et al, 1984, *Methods Enzymol.*, 104: 56
- Papahadjopoulos et al, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
88, 11460-4
- Pita et al, 1970, *Eur. J. Biochem.* 94: 11
- Plank, C.; Mechtler, K.; Szoka, F. J.; Wagner, E., 1996,
Hum Gene Ther 7: 1437-1446
- Roitt, I. M.; Brostoff, J., 1991, Male, C. K.:Kurzes
Lehrbuch der Immunologie; Thieme Verlag, 2. Auflage
- Sarin et al, 1981, *Anal. Biochem.* 117, 147-57
- Senior, J.; Delgado, C.; Fisher, D.; Tilcock, C.;
Gregoriadis, G., 1991, *Biochim Biophys Acta* 1062;
77-82
- Stryer, 1990, *Biochemie*, Kapitel 31, Verlag Spektrum der
Wissenschaft, Heidelberg
- Torchilin, V. P.; Klibanov, A. L.; Huang, L.; S, O. D.;
Nossiff, N. D.; Khaw, B. A., 1992, *Faseb J* 6; 2716-9
- Torchilin, V. P., et al., 1994, *Biochim Biophys Acta*
1195, , 181-184
- Torchilin, V. P., und Papisov, M. I., 1994, *J Liposome*
Res 4(1), , 725-739
- Wirth et al, 1991, *Bioorg. Chem.*, 19: 133
- Woodle, M. C.; Newman, M. S.; Cohen, J. A., 1994, *J Drug*
Target 2; 397-403
- Yoshinaga et al, 1989, *J. Bioactive Comp. Polym.*, 4: 17
- Yoshioka, 1991, *Biomaterials* 12, 861-4
- Zalipsky, S. und Barany, G., 1990, *J Bioact Compatible*
Polym 5: 227
- Zalipsky, S., 1993, *Biocunjugate Chemistry* 4, 296-299
- Zalipsky, S., et al., 1997, *Bioconjugate Chemistry* 8,
111-118

Patentansprüche

1. Komplexe aus Nukleinsäure und Polyethylenimin (PEI), dadurch gekennzeichnet, daß das PEI mit einem daran kovalent gekoppelten hydrophilen Polymeren modifiziert ist.
2. Komplexe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure DNA ist und das Verhältnis DNA zu PEI, ausgedrückt durch das molare Verhältnis der Stickstoffatome im PEI zu den Phosphataten in der DNA (N/P-Wert) etwa 2 bis etwa 100 beträgt.
3. Komplexe nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der N/P-Wert etwa 2 bis etwa 20 beträgt.
4. Komplexe nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der N/P-Wert etwa 3 bis etwa 10 beträgt.
5. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das PEI ein Molekulargewicht von etwa 700 D bis etwa 2000000 D aufweist.
6. Komplexe nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das PEI ein Molekulargewicht von etwa 2000 D bis etwa 800000 D aufweist.
7. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das hydrophile Polymer linear ist.

8. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das hydrophile Polymer ausgewählt ist aus der Gruppe Polyethylenglykole (PEG), Polyvinylpyrrolidone, Polyacrylamide, Polyvinylalkohole, oder Copolymeren davon.
9. Komplexe nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das hydrophile Polymer PEG ist.
10. Komplexe nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Molekulargewicht des hydrophilen Polymeren etwa 500 D bis etwa 20000 D beträgt.
11. Komplexe nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Molekulargewicht des hydrophilen Polymeren etwa 1000 D bis etwa 10000 D beträgt.
12. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis Polymer: primäre Aminogruppen/PEI etwa 1:10 bis etwa 10:1 beträgt.
13. Komplexe nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis etwa 1:5 bis etwa 5:1 beträgt.
14. Komplexe nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis etwa 1:3 bis etwa 1:1 beträgt.
15. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß PEI mit einem zellulären Liganden modifiziert ist.
16. Komplexe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand Transferrin ist.

17. Komplexe nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß PEI mit dem Liganden über das hydrophile Polymere verbunden ist.
18. Komplexe nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Nukleinsäure eine therapeutisch wirksame Nukleinsäure enthalten.
19. Verfahren zur Herstellung von Komplexen nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß zuerst DNA und, gegebenenfalls mit einem zellulären Liganden modifiziertes, PEI durch Mischen der verdünnten Lösungen komplexiert und anschließend das hydrophile Polymere an PEI gebunden wird.
20. Verfahren nach Anspruch 19, daß die DNA-Konzentration etwa 5 bis 50 μg DNA/ml beträgt.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Konzentration etwa 10 bis 40 μg DNA/ml beträgt.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Komplexierung bei einer Salzkonzentration unterhalb des physiologischen Werts durchgeführt wird.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Komplexierung in entionisiertem Wasser durchgeführt wird.

24. Verfahren zur Herstellung nach einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß im Anschluß an die Komplexierung von DNA und, gegebenenfalls modifiziertem, PEI die Komplexe aus der verdünnten Lösung auf eine Konzentration von etwa 200 $\mu\text{g/ml}$ bis 1 mg/ml, bezogen auf DNA, gebracht werden.
25. Zusammensetzung für die Transfektion von Säugetierzellen, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen oder mehrere Komplexe nach einem der Ansprüche 1 bis 18 in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ bis 1 mg/ml, bezogen auf DNA, enthält.
26. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen oder mehrere Komplexe nach Anspruch 18.
27. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Komplexe in einer Konzentration von etwa 200 $\mu\text{g/ml}$ bis etwa 1 mg/ml, bezogen auf DNA, enthält.
28. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Komplexe DNA enthalten, die für ein oder mehrere Zytokine kodiert.
29. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 26 oder 27 in Form einer Tumorstoffimpfung, dadurch gekennzeichnet, daß die Komplexe DNA enthalten, die für ein oder mehrere Tumorstoffantigene kodiert.

Zusammenfassung

Komplexe aus Nukleinsäure und Polyethylenimin (PEI), in denen PEI mit einem daran kovalent gekoppelten hydrophilen Polymeren, wie Polyethylenglykol, modifiziert ist sowie Verfahren zu deren Herstellung. An PEI ist gegebenenfalls ein zellulärer Ligand wie Transferrin gekoppelt. Die Komplexe können in kleiner Partikelgröße hergestellt und für den Transfer von therapeutisch wirksamen Genen in Säugetierzellen verwendet werden.

Fig. 1

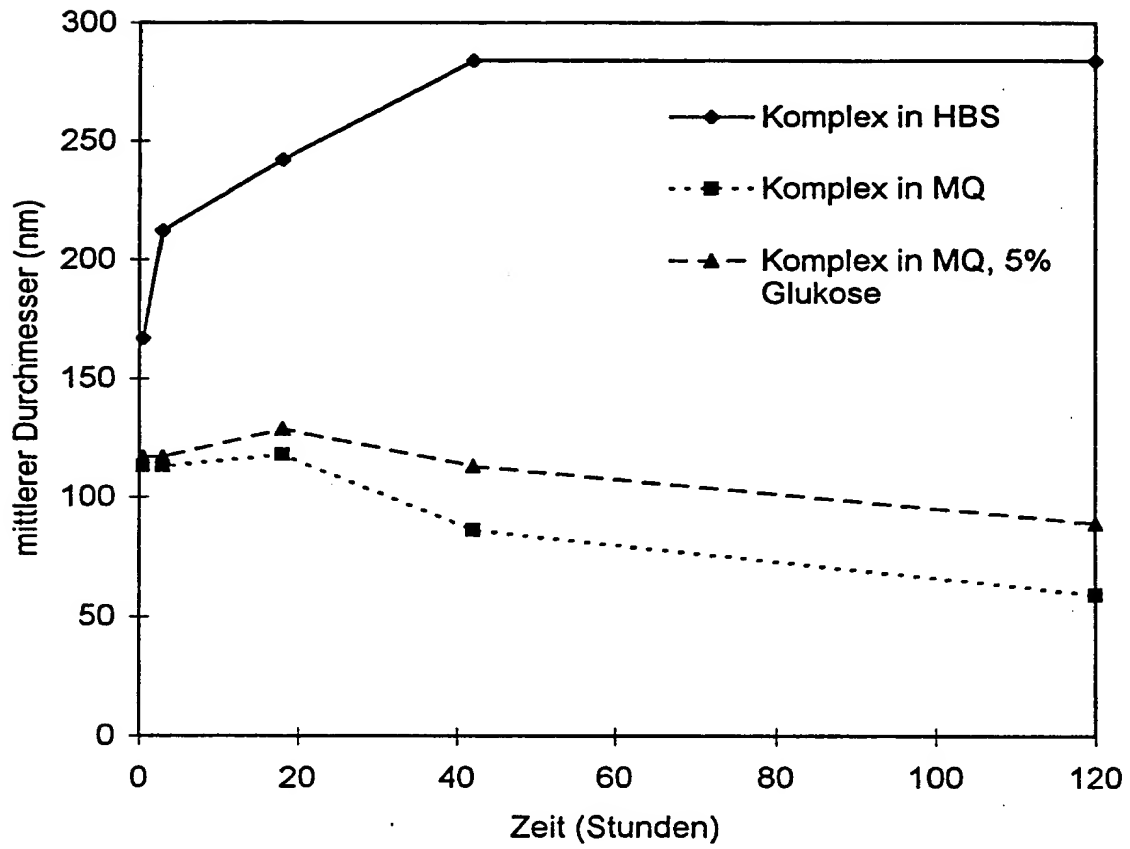


Fig. 2a

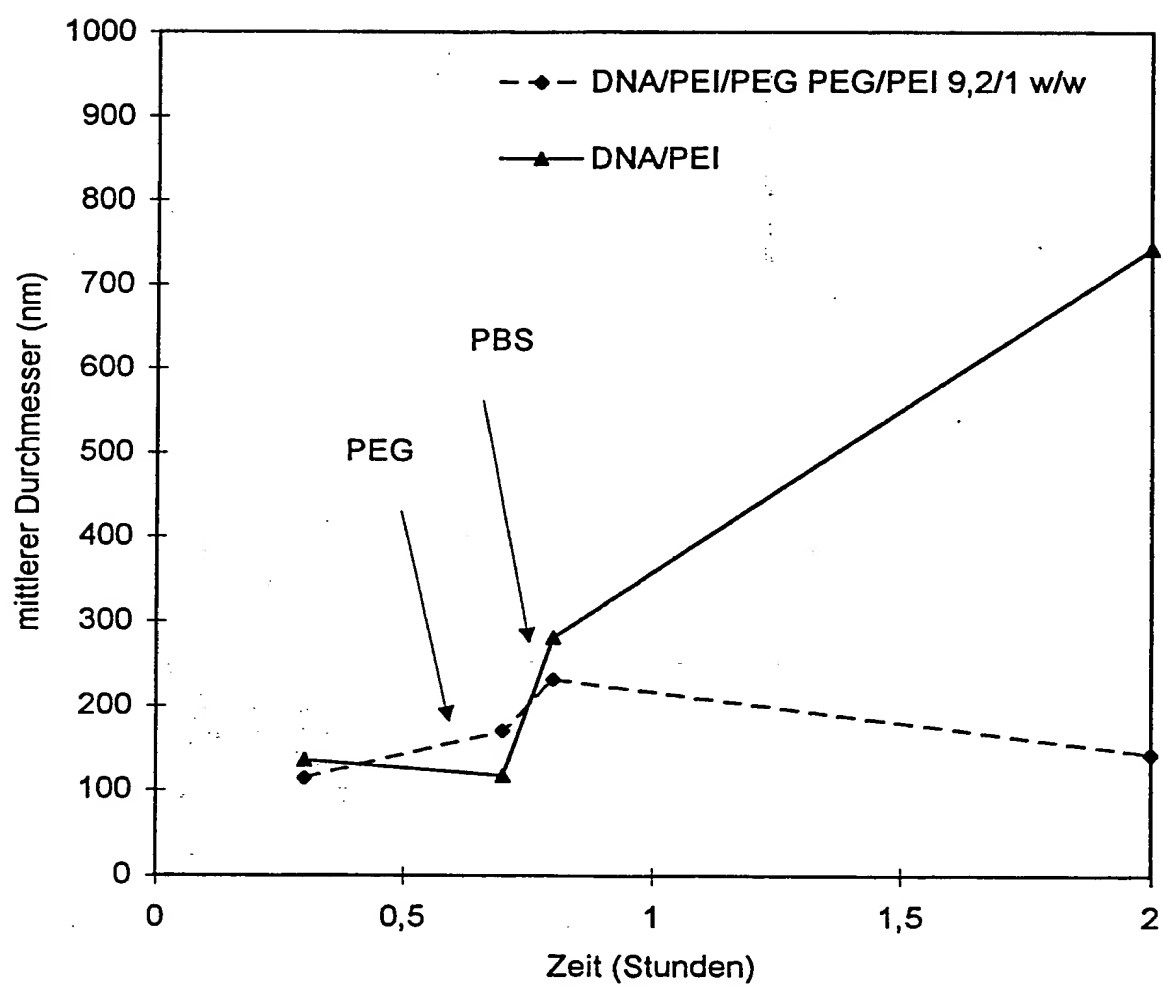


Fig. 2b

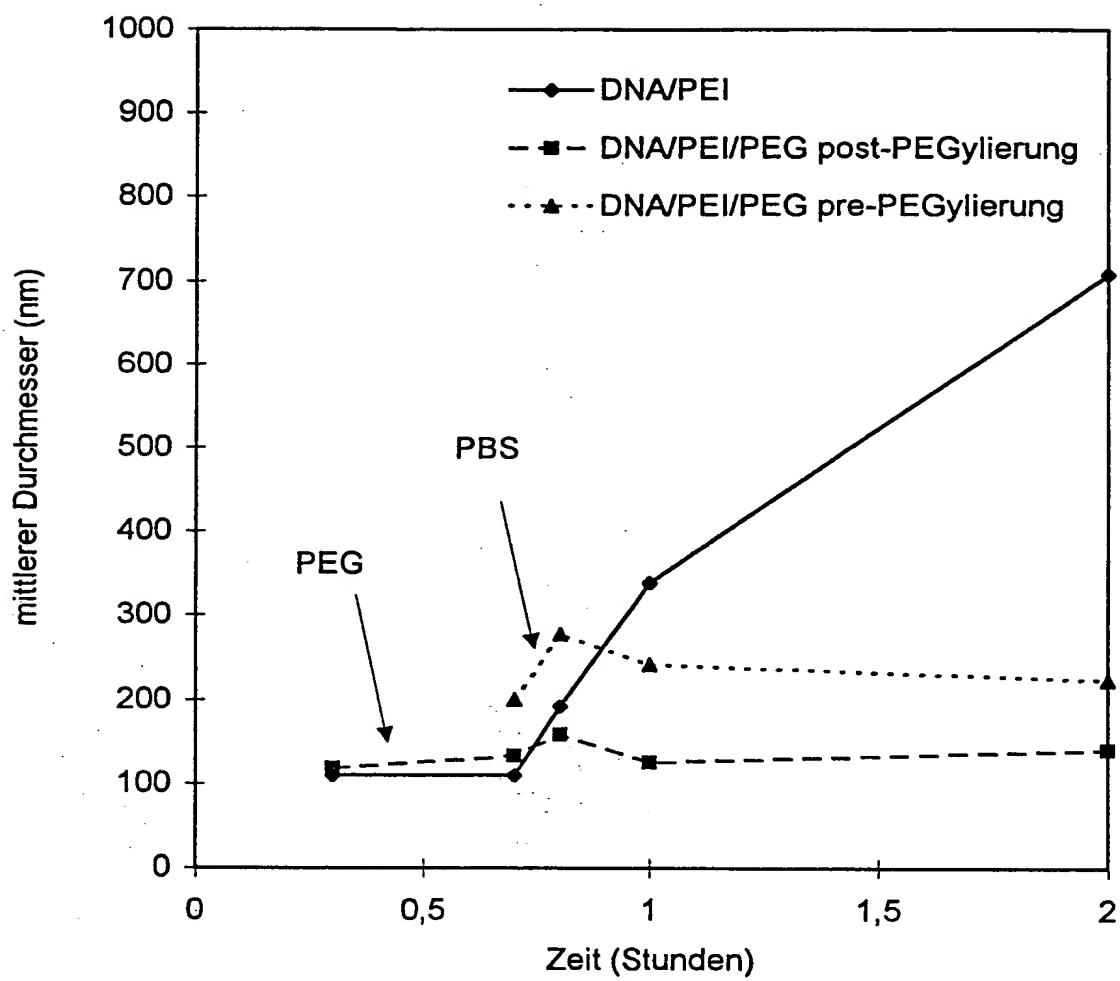


Fig. 2c

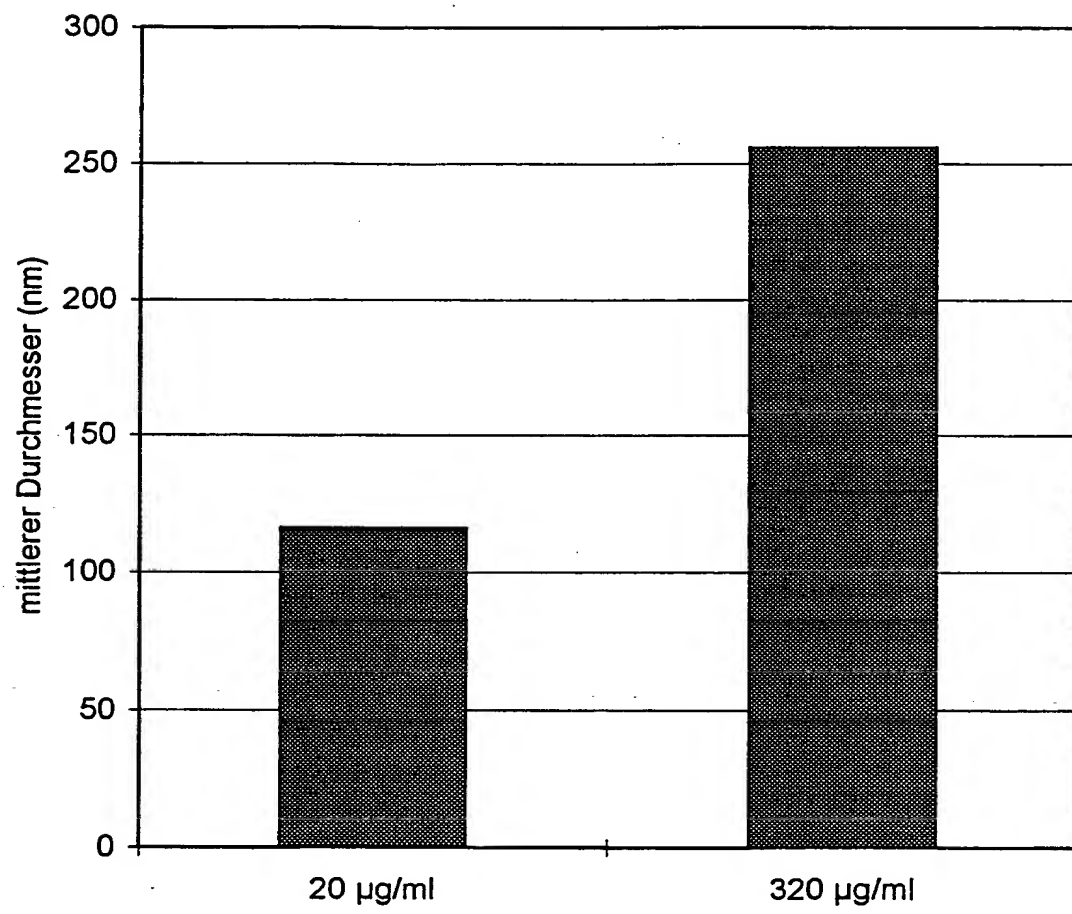


Fig. 3

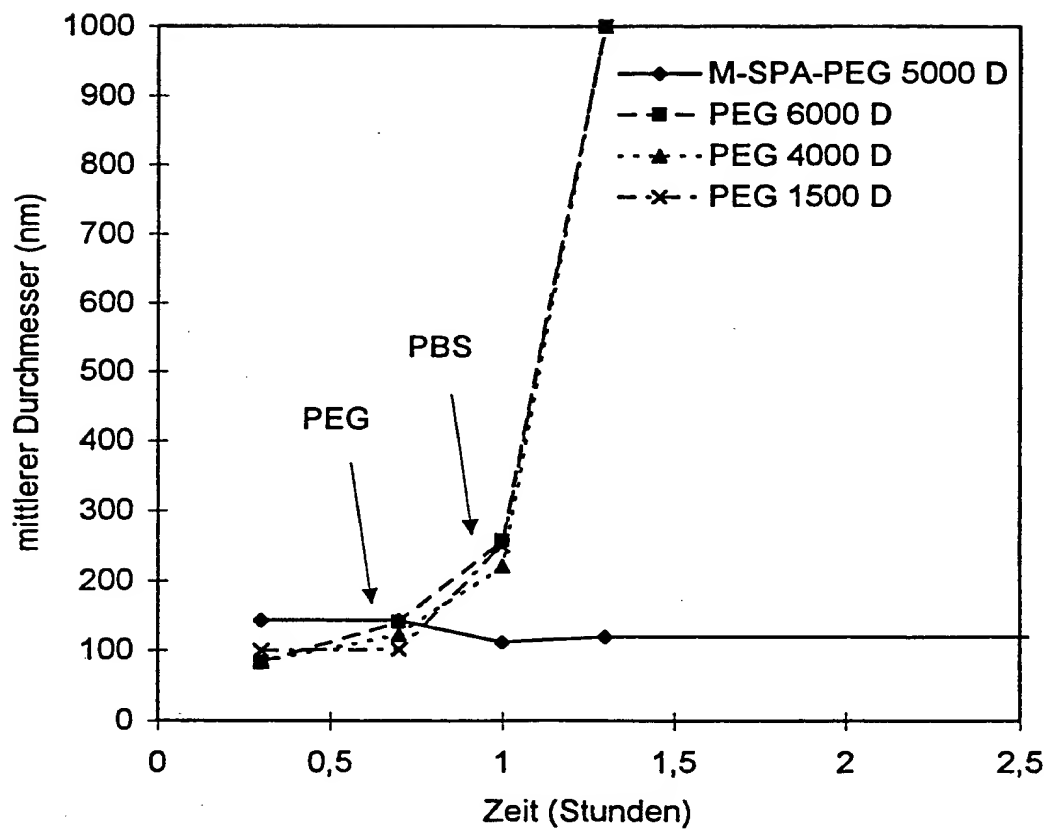


Fig. 4

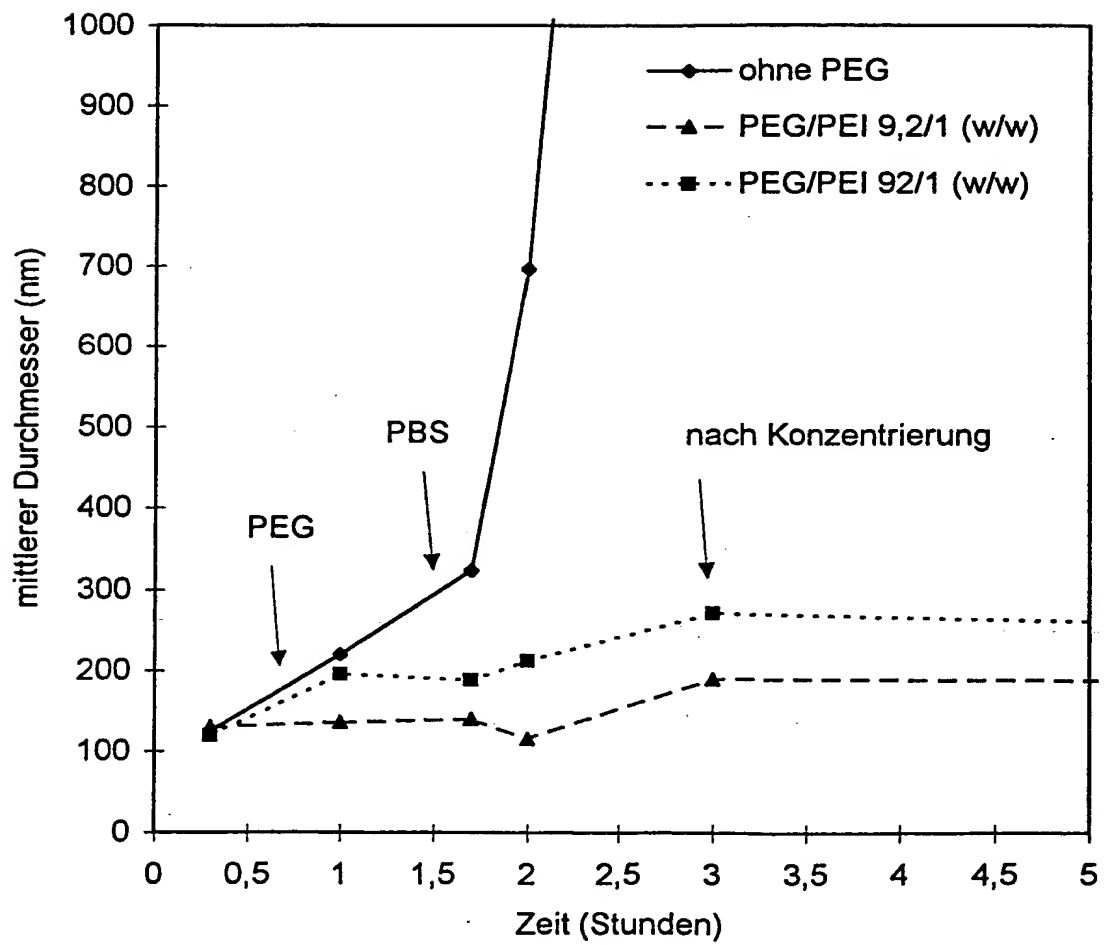
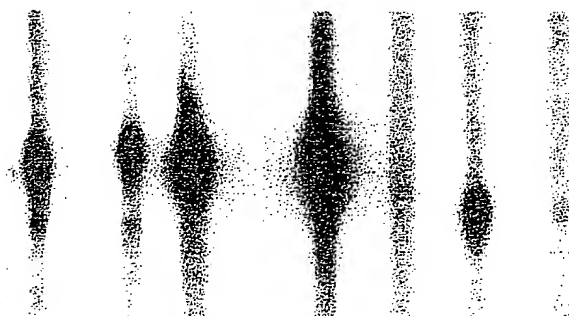


Fig. 5

Complement C3

1 2 3 4 5 6 7



Fibrinogen

1 2 3 4 5 6 7



Fibronectin

1 2 3 4 5 6 7



Fig. 6a

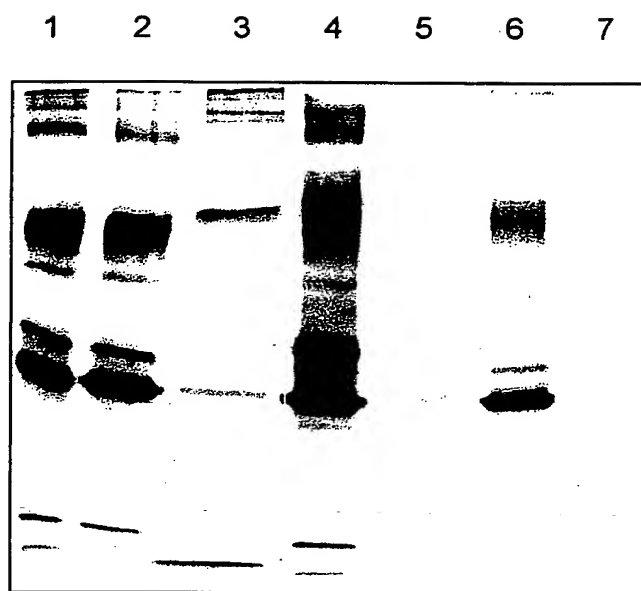


Fig. 6b

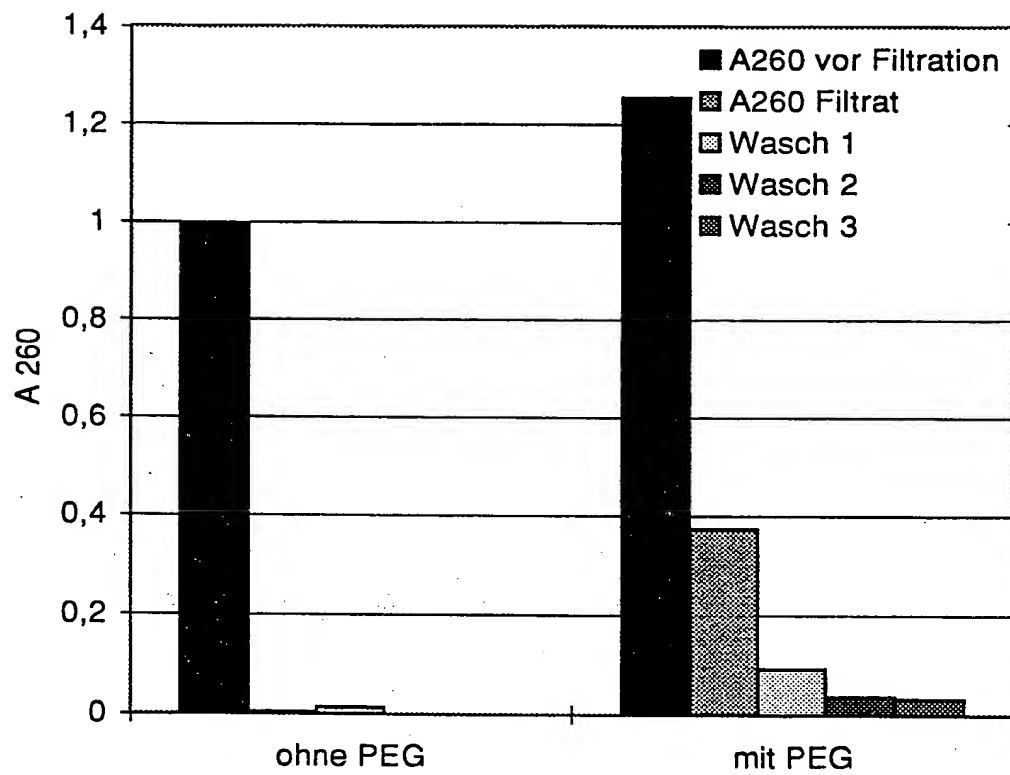


Fig. 7

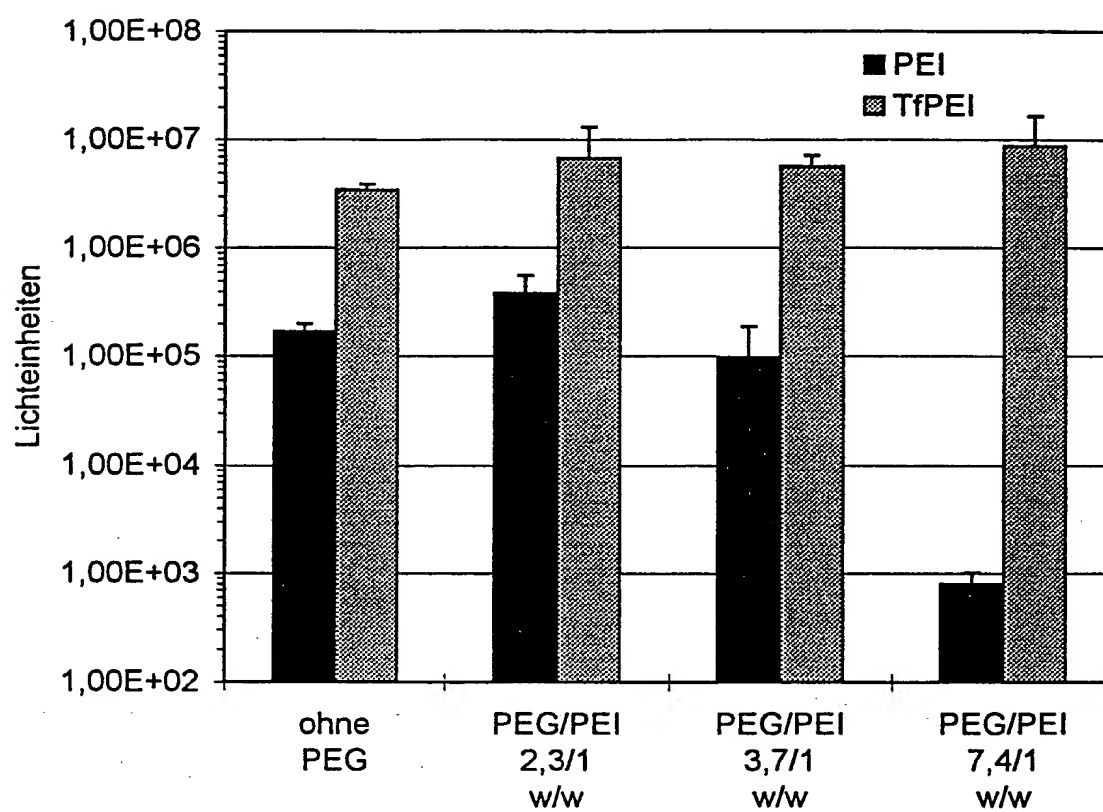


Fig. 8

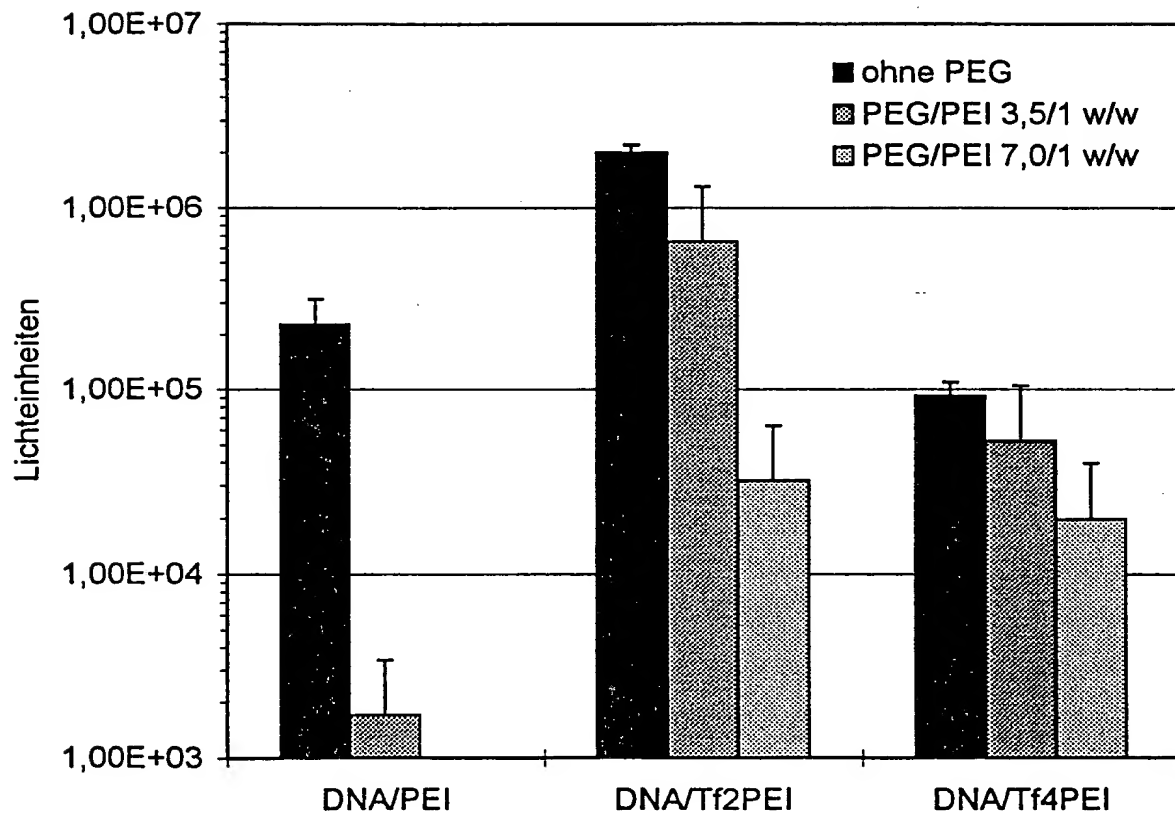


Fig. 9

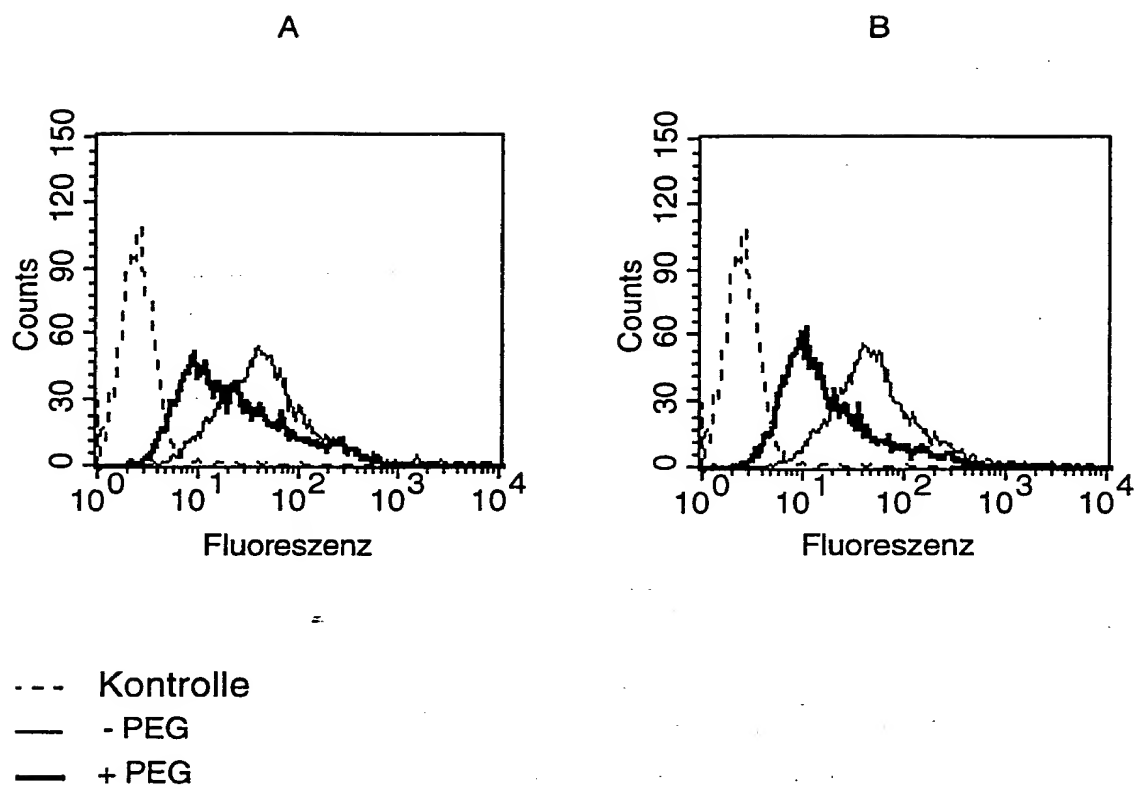


Fig. 10

